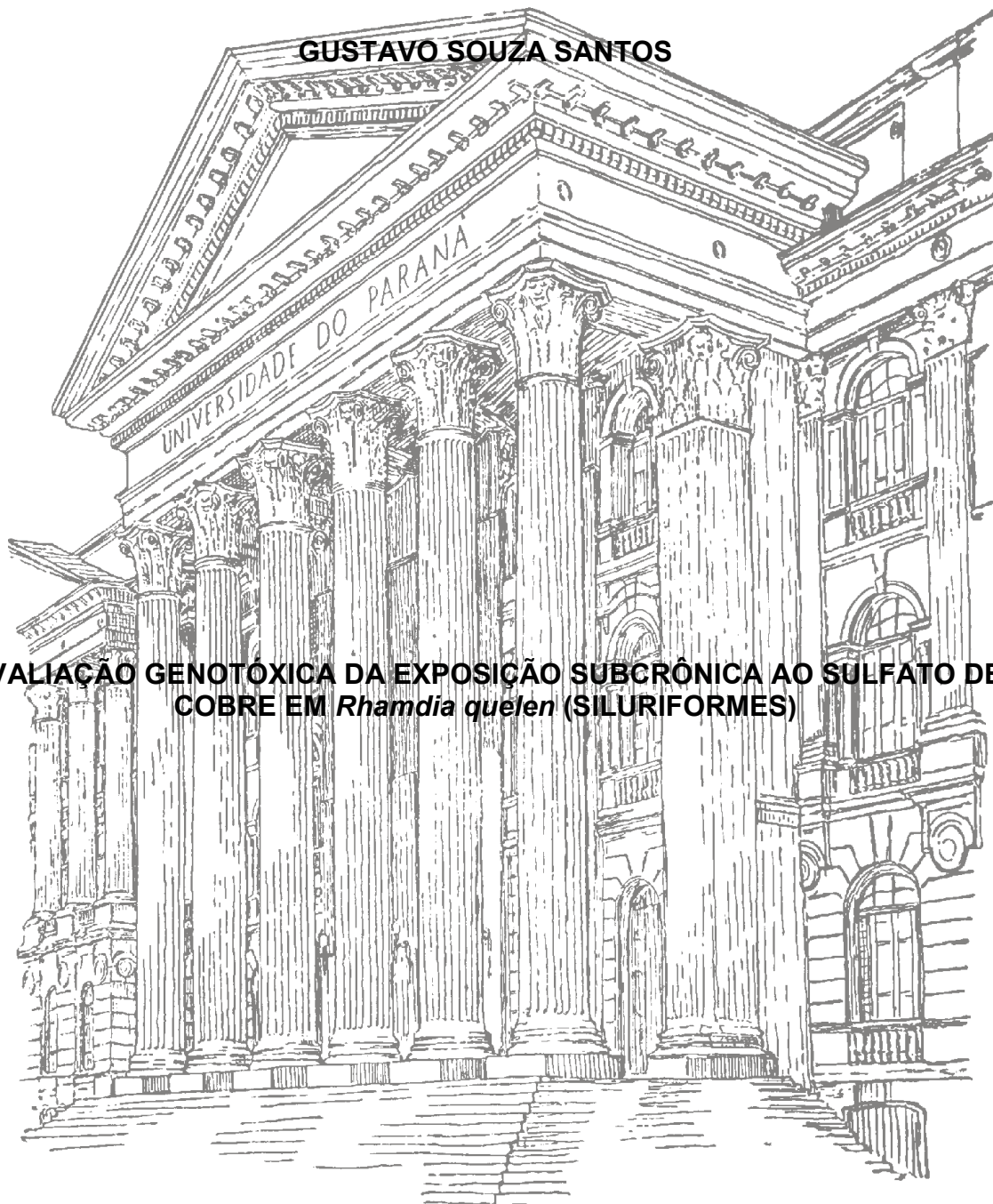


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO SULFATO DE
COBRE EM *Rhardia quelen* (SILURIFORMES)**



**CURITIBA
2010**

GUSTAVO SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO SULFATO DE
COBRE EM *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto à disciplina de Estágio em Genética (BG 016), do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

**CURITIBA
2010**

Dedico este trabalho aos meus pais que
sempre me apoiaram e foram compreensivos
com as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Marta Margarete Cestari pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, ensinamentos e principalmente pela dedicação em ajudar na minha formação como biólogo.

À Wane pelos ensinamentos e orientação desde quando eu entrei no laboratório, mas principalmente pela amizade.

Ao pessoal do lab: Balen, Laercio, Gabi, Tay, Paula, Toni, Tati, Wane, Igor, Adriele, Manu, Fucão e Cabelo.

Aos todos meus amigos da graduação em especial Dudu, Mario, Ju, Andréas, Clá, Laura, Vini, Aninha, Dé, Du, Duca, Miguel, Ferdi, Gabi e Luquinhas.

A todos meus amigos do Deaco, que sempre estiveram do meu lado e se tornaram as pessoas que eu posso confiar pra tudo.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas da UFPR, nos quais eu me espelho como pessoas e profissionais, e que sempre buscaram ensinar da melhor forma possível.

A toda minha família que sempre me apoiou, me incentivou e foram responsáveis pela minha formação como pessoa.

A Amanda, por ser sempre uma amiga que eu posso contar pra qualquer coisa, seja profissionalmente como pessoalmente.

Em memória, ao Professor Euclides Fontoura da Silva Junior, pela orientação e dois anos de ensinamentos no Museu.

Aos meus pais, que são os principais personagens da minha vida, sempre me apoiando, me incentivando, e compreendendo todas as decisões tomadas por mim. Mas principalmente pelo amor e carinho demonstrados.

À Deus, por ser meu equilíbrio e porto seguro em todos os momentos da minha vida.

"O jovem que quer ser cientista e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor, tem pelo menos três certezas:
a de que morrerá um dia (como todo mundo),
a de que não ficará rico (como quase todo mundo)
e a de que se divertirá muito (como pouca gente)."

Newton Freire-Maia

RESUMO

Peixes são comumente utilizados como bioindicadores para avaliar efeitos de contaminações por metais pesados por apresentarem bioacumulação. O cobre é um metal que em pequenas quantidades representa um elemento essencial à atividade de diversas enzimas biológicas, mas quando em grandes quantidades pode ser considerado tóxico. Sob a forma de sulfato de cobre é utilizado em pisciculturas como algicida. Mas, pouco se sabe a respeito da genotoxicidade do sulfato de cobre em peixes, desta forma, é necessário buscar estudar e avaliar a saúde das espécies de peixes que nela vivem. *Rhamdia quelen* (Jundiá) foi utilizada como bioindicador e através da utilização de três concentrações de sulfato de cobre como contaminantes, foram utilizados biomarcadores genéticos para avaliação da ação deste xenobiótico. Os exemplares de Jundiá foram inicialmente aclimatados em tanques e depois distribuídos em número de 2 exemplares por aquário. Utilizamos 24 aquários de 18 litros, totalizando 48 jundiás, sendo 13 jundiás utilizados como controle, 14 foram expostos a concentração de 30mg/kg do peso corporal do peixe de sulfato de cobre via trófica, 11 foram expostos a concentração de 50mg/kg e 10 foram expostos a concentração de 500mg/kg. A utilização da dose de 30 mg/kg se deve ao fato de ser o limite máximo de cobre presente em organismos consumíveis de acordo com a legislação brasileira. A dose de 50mg/kg de cobre representa o limite de migração do metal no alimento para organismos para consumo humano segundo legislação da América do Sul. E a dose de 500mg/kg representa a quantidade de cobre na qual se observam efeitos sub-letais em peixes. A alimentação foi realizada a cada 3 dias com uma mistura de ração e gelatina incolor. Os peixes passaram por um treinamento prévio de 15 dias recebendo alimentação em pinça (condicionamento) e após este período foram alimentados com o preparado (ração + gelatina + sulfato de cobre), por 60 dias (20 ciclos de contaminação). Após 60 dias os peixes foram eutanasiados com o auxílio de Benzocaína, e posteriormente foi coletado o sangue da veia caudal para a preparação das lâminas do teste do Micronúcleo Písceo e as brânquias para a realização do Ensaio Cometa. O teste do Micronúcleo Písceo não apontou atividade genotóxica do sulfato de cobre ($p > 0,05$), enquanto o Ensaio Cometa mostrou que houve efeito genotóxico nas brânquias para todas as concentrações utilizadas ($p < 0,05$). Esse resultado demonstrou uma sensibilidade maior do Ensaio Cometa em relação ao teste do Micronúcleo Písceo. Pode ser verificado que o sulfato de cobre se mostra genotóxico para o tecido branquial nas concentrações de 30mg/kg, 50mg/kg e 500mg/kg do peso corporal do peixe.

Palavras-chave: Sulfato de Cobre. *Rhamdia quelen*. Teste do Micronúcleo Písceo. Ensaio Cometa.

ABSTRACT

Fish are commonly used as bioindicators to assess the effects of contamination by heavy metals because they show bioaccumulation. Copper is a metal in small quantities is an essential element to the biological activity of several enzymes, but when in large quantities can be considered toxic. When copper is in the form of copper sulphate is used in fish farms as algicide. Very little is known about the genotoxicity of copper sulphate in fish, it is thus necessary to seek mechanisms that demonstrate the effects of this compound. Therefore, this study assesses the health of fish species siluriforms *Rhamdia quelen* (Jundiá) through the use of genetic biomarkers of environmental contamination for three concentrations of copper sulfate. Copies of Jundiá were initially acclimated in tanks and then put into 24 18 liters-aquariums, each containing two fish totaling 48. Of these, 13 specimens were used as controls, 14 were exposed to concentrations of 30mg/kg body weight of fish by trophic via of copper sulphate, 11 were exposed to concentrations of 50mg/kg and 10 were exposed to concentration of 500mg/kg. The use of 30 mg / kg is due to the fact that the ceiling of the copper present in organisms consumables in accordance with Brazilian law. The dose of 50mg/kg copper is the limit of total migration in organisms for human consumption under legislation in South America and the dose of 500mg/kg represent the amount of copper in which there are sub-lethal effects in fish. Feeding was performed every 3 days with a mixture of feed and colorless gelatin. The fish went through training prior to 15 days and fed pinch (conditioning) and after they were fed with the preparation (feed + gelatin), who received the dosage of copper sulphate, for 60 days (20 cycles of contamination). After 60 days the fish were killed with the aid of Benzocaine, and then blood was collected from the tail vein for preparation of slides of piscine micronucleus test and the gills to the achievement of the Comet assay. The piscine micronucleus test showed no genotoxic activity of copper sulphate ($p > 0.05$), while the Comet assay showed that there was genotoxic in the gills for all concentrations ($p < 0.05$). The statistical test of Kruskal-Wallis showed significant difference between control and contaminated specimens for the Comet assay, showing a greater sensitivity of this biomarker in relation to the piscine micronucleus test. It can be verified that the copper sulphate is shown genotoxic in concentrations of 30mg/kg, 50mg/kg and 500mg/kg body weight of the fish.

Key words: Copper Sulphate. *Rhamdia quelen*. Piscine Micronucleus Test, Comet Assay

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	EXEMPLARES DE <i>RHAMDIA QUELEN</i>	21
FIGURA 2	TANQUES DE 250 LITROS UTILIZADOS NA ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS.	22
FIGURA 3	LABORATÓRIO EXPERIMENTAL DE MUTAGÊNESE AMBIENTAL, COM OS AQUÁRIOS DE 18 LITROS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.	22
FIGURA 4	ERITRÓCITO NORMAL (A), ERITRÓCITOS COM ALTERAÇÕES DO TIPO NOTCHED (B, F), ERITRÓCITO COM ALTERAÇÃO DO TIPO BLEBBED (D), ERITRÓCITO COM ALTERAÇÃO DO TIPO VACUOLATED (E), ERITRÓCITO COM MICRONÚCLEO (C).	26
FIGURA 5	GRÁFICO REPRESENTANDO AS MEDIANAS DAS ALTERAÇÕES NUCLEARES TOTAIS OBTIDAS NO GRUPO CONTROLE E NOS TRÊS GRUPOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE COBRE.....	27
FIGURA 6	GRÁFICO REPRESENTANDO AS MEDIANAS DA ALTERAÇÃO NUCLEAR <i>VACUOLATED</i> OBTIDA PARA O GRUPO CONTROLE E NOS TRÊS GRUPOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE COBRE.....	28
FIGURA 7	GRÁFICO REPRESENTANDO AS MEDIANAS DA ALTERAÇÃO NUCLEAR <i>NOTCHED</i> OBTIDAS PARA O GRUPO CONTROLE E PARA OS TRÊS GRUPOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE COBRE.....	29
FIGURA 8	CLASSIFICAÇÃO DOS DANOS ENCONTRADOS NO ENSAIO COMETA.....	30
FIGURA 9	GRÁFICO REPRESENTANDO OS ESCORES ENCONTRADOS NO ENSAIO COMETA OBTIDOS PARA O GRUPO CONTROLE E PARA AS TRÊS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO DE COBRE.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Peixes.....	13
2.2 Cobre.....	14
2.3 Teste do Micronúcleo Písceo	16
2.4 Ensaio Cometa	17
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Material.....	20
4.2 Bioensaio.....	21
4.3 Biomarcadores	23
4.4 Teste do Micronúcleo Písceo	23
4.5 Ensaio Cometa com Brânquias	24
4.6 Análise estatística.....	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Teste do Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas Nucleares	26
5.2 Ensaio Cometa com tecido branquial	30
6 DISCUSSÃO.....	32
7 CONCLUSÕES.....	35
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Society of Toxicology, a toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, físicos ou biológicos sobre as pessoas, animais e meio ambiente. É uma ciência que combina elementos de diversas disciplinas científicas para nos ajudar a compreender os efeitos prejudiciais das substâncias químicas.

Dentro dessa área de estudo, que é muito ampla, temos uma parte que estuda os contaminantes que atingem diretamente o ambiente e seus componentes, chamada de ecotoxicologia. Na ecotoxicologia encontramos hoje uma gama muito grande de estudos que abrangem uma variedade de ecossistemas, perturbações naturais e antropogênicas, tornando difícil a compilação de dados para avaliar a influência desses componentes (KELLY & HARWELL, 1989).

A liberação excessiva de contaminantes químicos que causam toxicidade (poluição, por exemplo), é o foco da ecotoxicologia. Este representa um problema significativo que exige uma regulamentação, principalmente em algumas partes do mundo, onde o desenvolvimento ocorre rapidamente (CHAPMAN, 1995).

A ecotoxicologia também busca identificar e avaliar os efeitos de substâncias nos ambientes aquáticos, tais como rios, estuários, lagoas e oceanos próximos a grandes cidades que recebem esgotos e efluentes industriais. Estes efluentes têm sido agrupados de acordo com sua origem industrial, sendo a maioria composta por químicos e derivados, muitas vezes provenientes de indústrias de metais (HOUK, 1992).

A ecotoxicologia aquática se utiliza de testes para comprovar os riscos inerentes de compostos químicos ao ambiente. São necessárias metodologias que estejam bem estabelecidas e padronizadas, a fim de anular ao máximo as condições bióticas e abióticas que possam modificar os resultados reais da pesquisa. Com isso podemos juntar os estudos de campo e os testes de toxicidade realizados em laboratórios para obter uma melhor perspectiva da real ação da substância testada (CHAPMAN, 1995).

Estudos recentes referem-se à contaminação de rios e lagos por metais pesados, e como ela afeta os organismos existentes nestes ambientes. A contaminação por esses metais pesados pode afetar diretamente os indivíduos dos

ecossistemas aquáticos, bem como os seus processos dinâmicos (NACCI et al. 1996). Os estudos buscam compreender como e onde estes metais entraram no ambiente, os efeitos de acordo com o seu tempo de permanência e as interações deles com os seres vivos (FERRARO, 2003).

Muitos desses estudos são realizados a fim de avaliar a toxicidade aguda desses metais, sendo relativamente raros os que buscam avaliar essa toxicidade por um período de tempo prolongado. No entanto, estes estudos são importantes por demonstrarem os efeitos que os metais causam de forma semelhante ao que encontramos na natureza (WANG, GOULET & CHAPMAN, 2004).

Estudos de toxicidade permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação por metais, permitindo avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (PADRANGI *et al*, 1995).

O cobre é um metal, que apesar de em pequenas quantidades ser considerado um elemento essencial para a atividade de diversas enzimas biológicas, em grandes quantidades pode ser considerado tóxico (BHUNYA & JENA, 1996). Muitos dos metais em níveis baixos na dieta ou na água, são considerados nutrientes e algumas anomalias podem ser induzidas em peixes pela ingestão inadequada de cálcio, ferro, cobre, magnésio e zinco (HODSON, 1988). É um dos metais de transição mais abundante e pode ser altamente tóxico para peixes de água doce, em concentrações elevadas. A poluição por cobre pode surgir a partir da mineração, manufatura de bronze, galvanoplastia e uso excessivo de agrotóxicos constituídos por cobre (ÇOĞUN & KARGIN, 2004).

É importante ressaltar que os sais de cobre também são intencionalmente introduzidos nos corpos d'água como herbicidas, algicidas e moluscicidas. O sulfato de cobre, por exemplo, foi empregado como moluscicida em programas de controle da esquistossomose no Egito e outros países (WHO, 1993).

O sulfato de cobre é mundialmente utilizado para inibir o crescimento de algas em reservatórios municipais, equipamentos de irrigação, piscinas e sistemas de refrigeração industriais (WHO, 1998). Porém, somente 7% de sua produção é empregada no tratamento de água, 65% é utilizada na agricultura e 28% na indústria, incluindo a produção de cromoarseniato de cobre (preservante de madeira), galvanoplastia e manufatura de corantes (ATSDR, 1990). E apesar da quantidade de

sulfato de cobre que é utilizado exclusivamente no tratamento da água não ser muito relevante, suas outras aplicações impactam nos ambientes aquáticos, através dos resíduos que podem ser lançados diretamente nos rios e lagos sem tratamento adequado.

Algumas dessas aplicações acima citadas, bem como os efeitos dos metais nos seres vivos, levantaram questões que acarretaram a realização de muitos trabalhos científicos envolvendo principalmente bioensaios. A partir desse interesse, a genotoxicidade desses compostos foi testada em condições laboratoriais, usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras e plantas. Interesses também têm sido focados em testes de laboratório usando organismos aquáticos, como anfíbios, moluscos e peixes (MINISSI; CICCOTINI; RIZZONI, 1996).

Vários biomarcadores têm sido utilizados para avaliação dos efeitos da poluição sobre esses organismos. VAN DER OOST (2003), classificou biomarcador como uma mudança de uma resposta biológica, desde o nível molecular até o fisiológico, relacionada à exposição de substâncias químicas no ambiente. Dentre estes se incluem os biomarcadores genéticos, testes que buscam avaliar aberrações cromossômicas, adutos de DNA, quebras no DNA e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL et al, 2001).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peixes

A utilização de peixes em testes de toxicidade é bem documentada e eles são considerados bons indicadores de toxicidade devido à sua importância ecológica e comercial (MASUTTI *et al*, 2006).

Peixes são passíveis de experimentos de campo e de laboratório e podem ser facilmente criados sob condições de laboratório. Há muita informação disponível sobre a criação destes animais disponível, devido a centenas de anos de experiência prática por piscicultores e aquicultores. São mais baratos para se comprar e se produzir em relação aos mamíferos, aves, répteis ou anfíbios (POWERS, 1989). E por várias razões, as espécies de peixes têm atraído um interesse considerável nos estudos de avaliação biológica e as respostas bioquímicas de contaminantes ambientais (POWERS, 1989).

Os peixes podem agir como organismos sentinelas para indicar a genotoxicidade de certas substâncias que num futuro serão expostas a populações humanas. Isso porque eles podem responder de forma semelhante ao homem à exposição a substâncias químicas, por também sofrerem bioacumulação (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Existem três formas de bioacumulação em organismos aquáticos: através da bioconcentração, que consiste na captação direta do contaminante da água através da pele ou das brânquias, através da ingestão, que é captação de partículas em suspensão e através da biomagnificação, que consiste no consumo de alimentos contaminados. Mesmo sem efeitos agudos ou crônicos detectáveis em testes de ecotoxicidade padrão, a bioacumulação deve ser considerada como um critério de risco, já que alguns efeitos só podem ser reconhecidos numa fase posterior da vida ou manifestar apenas em membros superiores da cadeia alimentar (VAN DER OOST, 2003).

Por isso, podemos considerar os peixes como um dos monitores biológicos mais importantes no estudo de poluentes genotóxicos aquáticos (MANA, BANERJEE, GUPTA, 1985).

Alguns trabalhos citam a espécie *Rhamdia quelen* como modelo de estudos científicos relacionados a controle de parasitas em peixes, como possíveis sinalizadores de toxicidade de certos compostos e controle de salinidade (SOUZABASTOS & FREIRE, 2009; FERRARO, 2009; CAMARGO, POUHEY, VAZ, 2006). FERRARO (2009) demonstrou que a espécie utilizada nesse trabalho, *Rhamdia quelen* é um bom bioindicador, quando utilizamos os biomarcadores Ensaio Cometa e o Teste do Micronúcleo Písceo.

2.2 Cobre

O cobre é um metal marrom-avermelhado e nobre, é pertencente ao grupo IB da Tabela Periódica. Possui elevada condutividade térmica e elétrica, maleabilidade, baixa corrosividade, capacidade de se amalgamar e aspecto agradável. Apresenta quatro estados de oxidação: metálico (Cu^0), íon cuproso (Cu^+), íon cúprico (Cu^{++}) e íon trivalente (Cu^{+++}) (WHO, 1998).

O estado de oxidação mais importante no meio aquático ou *in natura* é o bivalente. O íon cúprico liga-se preferentemente a ligantes inorgânicos como H_2O , OH^- , CO_3^{2-} e SO_4^{2-} , via oxigênio, mas pode também se ligar a compostos orgânicos (PEDROZO & LIMA, 2001). Os compostos cúpricos são geralmente solúveis em água, e de coloração azul ou verde (WHO, 1998; ATSDR, 1990; BARCELOUX, 1999).

O cobre é amplamente distribuído na natureza em seu estado livre e em sulfitos, arsenitos, cloretos e carbonatos. Em ambientes aquáticos, o cobre ocorre tanto na forma solúvel como particulada e coloidal, sendo essas duas últimas as mais frequentes. Seu transporte se dá principalmente na forma adsorvida, sendo adsorvido rapidamente aos sedimentos, resultando em níveis de resíduos muito altos (MOORE e RAMAMOORTHY, 1984).

Sabe-se que o cobre é essencial para vários organismos e está presente em reservatórios aquáticos naturais e nos sedimentos (LINDER, 2001). Sua importância como elemento essencial aos seres vivos pode ser demonstrada pelo grande número de proteínas e enzimas dependentes desse metal, participando de inúmeros processos biológicos, onde desempenham funções variadas (KAIM & SCHWEDERSKI, 1995).

Vários metais como Cu e Zn desempenham um papel importante na funcionalidade de algumas proteínas como metaloenzimas, proteínas de estresse ou de atividade redox (CAMAKARIS, VOSKOBOINIK & MERCER, 1999). No entanto, acima de um nível fisiológico, estes metais dão toxicidade com implicações patológicas. Em comparação com a literatura de mamíferos, o número de estudos sobre a toxicidade crônica e os efeitos fisiológicos do Cu em peixes são limitadas.

Há relativamente poucos dados de toxicidade crônica para exposições tróficas de Cu. A dose letal para a truta arco-íris é superior a 10 g Cu / kg de alimento e efeitos subletais ocorrem entre 1000 e 500 mg Cu / kg de alimento (HANDY, 2003).

Provavelmente o trabalho com a exposição crônica mais longa e abrangente é de MCKIM e BENOIT (1971), na qual a espécie de truta *Salvelinus fontinalis* foi exposta aos efeitos subletais do cobre por 18 meses.

O cobre está presente em grande quantidade no ambiente e parece ser relativamente abundante (cerca de 60mg / kg) na crosta terrestre, como óxido de cobre, sulfato de cobre e outros minérios (FLEMMING & TREVORS, 1989; WHO, 1998). A toxicidade em organismos aquáticos pode ocorrer em concentrações de 10 a 50 vezes maiores que as concentrações requeridas por um indivíduo (HILL, 1997).

O sulfato de cobre é um subproduto na produção de cobre, formado durante a refinação do minério com ácido sulfúrico (ATSDR, 1990; BURGESS, 1995). A toxicidade desse composto é demonstrada na literatura nas doses de 0,4mg a 100mg de cobre e os sintomas relatados em humanos foram vômitos, sensação de ardor epigástrico, diarreia, letargia, anemia hemolítica aguda, dano renal e hepático, neurotoxicidade, aumento da pressão sanguínea e frequência respiratória (BARCELOUX, 1999; WHO, 1998).

Em um trabalho de SINA et al. (1983) houve a indução de aberrações cromossômicas em hepatócitos de ratos tratados com sulfato de cobre. BHUNYA e JENA (1996) verificaram seu efeito clastogênico em filhotes de *Gallus domesticus* através dos ensaios de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em células da medula óssea.

O sulfato de cobre se mostrou mutagênico em peixes no trabalho de CAVAS, GARANKO & ARKHIPCHUK (2005) no qual eles verificaram o efeito do composto nas espécies bioindicadoras *Cyprinus carpio* e *Carassius gibelio*. Foi demonstrado que a dose 0,25 mg/L induz aumento na frequência de micronúcleos em sangue periférico,

células de brânquias e de fígado, com uma maior sensibilidade destes tecidos em comparação ao sangue periférico.

2.3 Teste do Micronúcleo Písceo

O Teste do Micronúcleo Písceo baseia-se na detecção de pequenos núcleos (micronúcleos) formados por fragmentos restantes de danos cromossômicos induzidos por agentes mutagênicos, ou por cromossomos que se atrasaram em relação ao fuso mitótico (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975; YAMAMOTO & KIKUCHI, 1980).

HOOFTMAN e DE RAAT (1982), tomando por base o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido por SCHMID (1975) para células da medula óssea de camundongos, introduziram-no nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO, TILBURY & MYERS, 1990).

Devido aos peixes terem um grande número de cromossomos, e muitas vezes de pequeno tamanho, as análises das metáfases para avaliação de aberrações cromossômicas são dificultadas, enquanto que o estudo de micronúcleos é fácil e possível de ser realizado em eritrócitos, devido ao fato destes serem nucleados (HAYASHI et al., 1998).

HOSE *et al.* (1987) descreveram alterações morfológicas nos núcleos de eritrócitos circulantes de peixes. Estas alterações são passíveis de serem utilizadas como indicadores dos efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água ao serem incluídas nas contagens dos micronúcleos.

Estas alterações podem ser classificadas segundo CARRASCO, TYLBURY & MYERS (1990) como:

a) *Blebbid*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. O tamanho destas evaginações situa-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.

b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *Blebbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.

c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.

d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envelope nuclear.

Sugere-se que as anomalias nucleares devem ser incluídas nas análises de genotoxicidade em peixes baseadas na contagem de micronúcleo, por apresentar resultados mais confiáveis e mais completos (AYLLON & GARCIA-VAZQUEZ, 2001).

2.4 Ensaio Cometa

O ensaio cometa também conhecido como SCGE (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), investiga danos no DNA ao nível celular individual através da medição da migração em gel do DNA de células depois de uma corrida eletroforética (SINGH et al., 1988). O nome cometa refere – se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001).

Consiste num método versátil e relativamente barato para a avaliação da genotoxicidade. Pode ser utilizado praticamente em qualquer tipo de célula nucleada e de qualquer espécie.

O comprimento da cauda do cometa, o qual é uma medida de genotoxicidade, pode ser influenciado por vários fatores, como o tempo de desenovelamento do DNA antes da eletroforese (PROVOST *et al*, 1993; SINGH & STEPHENS, 1997).

O relaxamento da condensação e as quebras na estrutura molecular são ocasionados por danos diretos à molécula de DNA (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; COLLINS *et al*. 2008).

O ensaio cometa é uma ferramenta interessante para a demonstração de genotoxicidade de exposições a contaminantes e para investigar os impactos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental

(BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). Apresenta alta sensibilidade, permitindo obter resultados a partir de poucas células, e os dados podem ser extraídos de cada célula individualmente (SASAKI et al., 1997).

O tecido mais pesquisado através do ensaio cometa é o sanguíneo, devido aos eritrócitos serem facilmente coletados. Outros tecidos que também podem ser utilizados são do fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo, das brânquias, devido ao seu contínuo contato com a fase aquosa e do rim, tecido produtor de sangue em peixes (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

A característica de algumas substâncias genotóxicas em serem tecido-específicas, torna o ensaio cometa ideal para avaliar os danos do contaminante sobre um tecido específico (RAMSDORF, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a genotoxicidade de sulfato de cobre nas concentrações de 30mg/kg, 50mg/kg e 500mg/kg do peso corporal do jundiá (*Rhamdia quelen*) em contaminação trófica sub-crônica (60 dias – 20 ciclos de contaminação).

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a genotoxicidade de sulfato de cobre nas concentrações de 30mg/kg, 50mg/kg e 500mg/kg do peso corporal do jundiá (*Rhamdia quelen*) através da aplicação do Teste de Micronúcleo Píscico;

Avaliar a genotoxicidade de sulfato de cobre nas concentrações de 30mg/kg, 50mg/kg e 500mg/kg do peso corporal do jundiá (*Rhamdia quelen*) através da aplicação do teste do Ensaio Cometa em células branquiais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

O jundiá (Figura 1) é um peixe que pertence a seguinte divisão taxonômica: Classe: Osteichthyes, Série: Teleostei, Ordem: Siluriformes, Família: Pimelodidae, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *Rhamdia quelen*.

Atingem tamanho de 35 cm. Suporta variações de pH na faixa de 6,0 – 7,5 e temperaturas na faixa de 18°C a 30°C. Possui hábitos noturnos, preferindo ficar junto ao fundo onde pode se misturar as folhas e galhos caídos. Vive em profundidades de 0 a 3 m, alimentando-se de invertebrados aquáticos e terrestres. É um peixe de movimentos lentos e suaves. Esta espécie tem distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul (SILFVERGRIP, 1996).

Adultos de *Rhamdia quelen* são onívoros, com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, e detritos orgânicos. Os organismos encontrados no conteúdo gastrintestinal de *Rhamdia quelen* não são restritos ao *habitat* bentônico, indicando que essa espécie é generalista com relação à escolha de alimento (GUEDES, 1980).

O cultivo desta espécie vem crescendo progressivamente no Brasil, ela é bem adaptada a diferentes ambientes e amplamente utilizada em viveiros de piscicultura (GOMES *et al.*, 2000).

Foram utilizados um total de 48 exemplares de jundiá nos bioensaios, sendo 13 utilizados como controle, 14 expostos a concentração de 30mg/kg, 11 expostos a concentração de 50mg/kg e 10 expostos a concentração de 500mg/kg.



FIGURA 1 EXEMPLARES DE *Rhamdia quelen*.

FONTE: Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (2010)

4.2 Bioensaio

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Bioensaios de Mutagênese Ambiental no Departamento de Genética. Após o período de aclimação em tanques de 250 litros (Figura 2), os peixes foram colocados em aquários e condicionados a se alimentarem com ração preparada com gelatina incolor. Foram colocados 2 peixes por aquário de 18 litros (Figura 3). Os peixes foram expostos a três concentrações de sulfato de cobre, sendo estas de 30mg/kg, 50mg/kg e 500mg/kg do peso corporal do peixe. Os jundiás receberam a ração preparada por 20 ciclos de contaminação (60 dias). Para o grupo controle foi ministrada apenas a ração preparada com gelatina e para os grupos tratados o xenobionte foi injetado na ração preparada com gelatina e posteriormente ofertada aos peixes. Os jundiás foram eutanasiados para a realização de diversos testes genotóxicos, bioquímicos e histopatológicos. Para o presente trabalho foram realizados o Teste do Micronúcleo Píscico em eritrócitos e do Ensaio Cometa em células branquiais.

A utilização da dose de 30 mg/kg de cobre se deve ao fato dessa ser o limite máximo presente em organismos consumíveis de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1965). A dose de 50mg/kg de cobre representa o limite de migração do metal no alimento para organismos para consumo humano segundo legislação da

América do Sul (PANDULA & CUERVO, 2004). A dose de 500mg/kg representa a dose de cobre na qual ocorrem efeitos sub-letais em peixes segundo, HANDY (2003).



FIGURA 2 TANQUES DE 250 LITROS UTILIZADOS NA ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS.
FONTE: Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (2010)

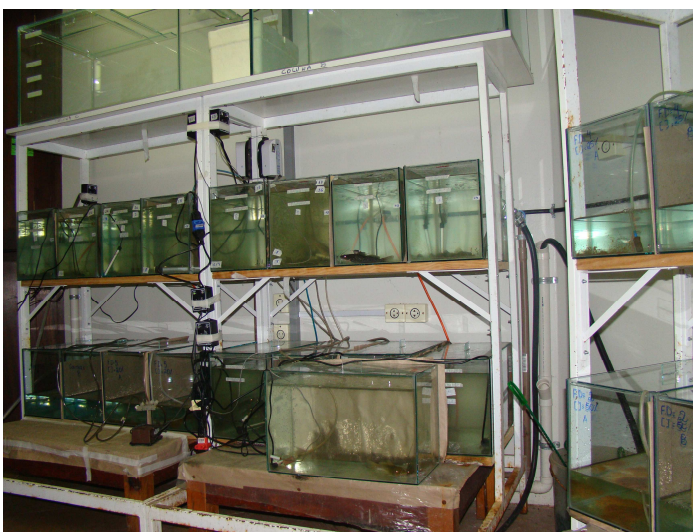


FIGURA 3 LABORATÓRIO EXPERIMENTAL DE MUTAGÊNESE AMBIENTAL, COM OS AQUÁRIOS DE 18 LITROS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.
FONTE: Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (2010)

4.3 Biomarcadores

Os testes de genotoxicidade utilizados nos peixes submetidos ao bioensaio, foram: teste de micronúcleo písceo, para avaliação da frequência de micronúcleos e outras anormalidades morfológicas nucleares; ensaio cometa em células das brânquias, para análises de quebras no material genético. Outros testes como ensaio cometa em eritrócitos e em células de outros tecidos foram realizados pela doutoranda Paula Moiana de Costa.

4.4 Teste do Micronúcleo Písceo

O Teste do Micronúcleo Písceo foi realizado de acordo com a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), com algumas modificações de FERRARO et al (2004).

A técnica aplicada consistiu das etapas:

- a) As lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) O sangue do peixe foi coletado com seringa e agulha heparinizadas e uma gota foi depositada na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula foi feito o esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina (técnica de extensões sanguíneas).
- c) Foi confeccionada uma lâmina por peixe.
- e) As lâminas, após a secagem ao ar, foram fixadas em etanol 96% por 30 minutos.
- f) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos e lavadas em água corrente.
- g) Foram analisadas 2000 células de cada peixe em teste cego, sendo que somente foram consideradas na análise hemácias nucleadas com membrana nuclear e citoplasmática intactas. Foram consideradas como micronúcleos as partículas que, em relação ao núcleo principal não excederam 1/3 do seu tamanho, apresentavam-se nitidamente separadas do núcleo principal, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também foram analisadas, as alterações morfológicas nucleares segundo CARRASCO; TILBURY; MYERS (1990) como:

- e) *Blebbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. O tamanho destas evaginações situa-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- f) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *Blebbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- g) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- h) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envelope nuclear.

4.5 Ensaio Cometa com Brânquias

A técnica utilizada para o Ensaio Cometa foi descrita por SINGH *et al.*, em 1988, com modificações segundo RAMSDORF *et al.*, 2009. Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com uma cobertura de agarose normal e também foi preparada a agarose de baixo ponto de fusão (LMP). Os animais sacrificados foram previamente anestesiados com benzocaína e as brânquias coletadas foram separadas do arco branquial com um bisturi e somente os filamentos branquiais foram armazenados em tubo de microcentrífuga do tipo ependorf com soro bovino fetal e em seguida este tubo foi mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz até a montagem das lâminas.

A técnica aplicada consiste nas seguintes etapas que devem ser feitas com ausência de luz:

- 01) O tecido branquial foi desagregado em soro bovino fetal. 40 μ L desta suspensão celular foi adicionado a 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão e este conteúdo foi colocado sobre a lâmina previamente coberta com agarose normal.
- 02) Foi colocada uma lamínula sobre a suspensão e o conjunto foi acondicionado em refrigerador por 15 minutos.

03) Decorrido o tempo, as lamínulas foram gentilmente retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise e novamente levadas ao refrigerador (4°C). As lâminas ficaram na lise por 72 horas.

05) Após este tempo, as lâminas foram colocadas na cuba horizontal de eletroforese preenchendo o máximo possível de espaços. Caso fosse necessário, os espaços foram completados com lâminas limpas.

06) Em seguida foi adicionado o tampão de eletroforese suavemente até cobrir as lâminas. O tampão de eletroforese (pH>13) agiu por 30 minutos antes da corrida eletroforética sobre o DNA para que este “relaxe”.

07) A eletroforese foi realizada mergulhada em cuba em gelo (4°C) a 15V e 300 mA por 25 minutos.

08) Terminada a eletroforese as lâminas foram cuidadosamente retiradas e neutralizadas com 5ml de solução de neutralização, por 5 minutos.

09) A neutralização foi repetida por mais duas vezes.

10) Em seguida as lâminas secaram na posição inclinada e foram fixadas com etanol por 5 min.

11) As lâminas foram colocadas em geladeira até o momento de serem analisadas.

12) Para a análise a coloração foi realizada com 20 µL de brometo de etídio que é colocado sobre a lâmina e em seguida coberto com uma lamínula.

13) A lâmina foi analisada em microscópio de epifluorescência em aumento de 400X.

14) Os nucleóides foram contados em número de 100 por exemplar e avaliado segundo a dispersão do DNA (cauda).

15) Com os valores classificados para os 100 nucleóides por lâmina, calculamos um escore com a seguinte fórmula:

$$\text{Escore} = (\text{n}^\circ \text{Dano } 0) \times 0 + (\text{n}^\circ \text{Dano } 1) \times 1 + (\text{n}^\circ \text{Dano } 2) \times 2 + (\text{n}^\circ \text{Dano } 3) \times 3 + (\text{n}^\circ \text{Dano } 4) \times 4$$

4.6 Análise estatística

Foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis através do programa BioEstat 5.0, considerando o nível de significância de $p < 0,05$. O teste foi empregado em todos os biomarcadores (teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa em células de brânquia) para comparar os resultados entre os indivíduos controle e os contaminados com Sulfato de Cobre.

5 RESULTADOS

5.1 Teste do Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas Nucleares

Foram analisadas 2000 células com membrana celular intacta para cada exemplar. As alterações morfológicas nucleares foram contadas separadamente, e classificadas segundo CARRASCO, TILBURY & MYERS, 1990 (Figura 4). Foi também contabilizada a presença de micronúcleos juntamente com o total de alterações morfológicas nucleares e esse valor foi submetido ao teste estatístico de Kruskal-Wallis.

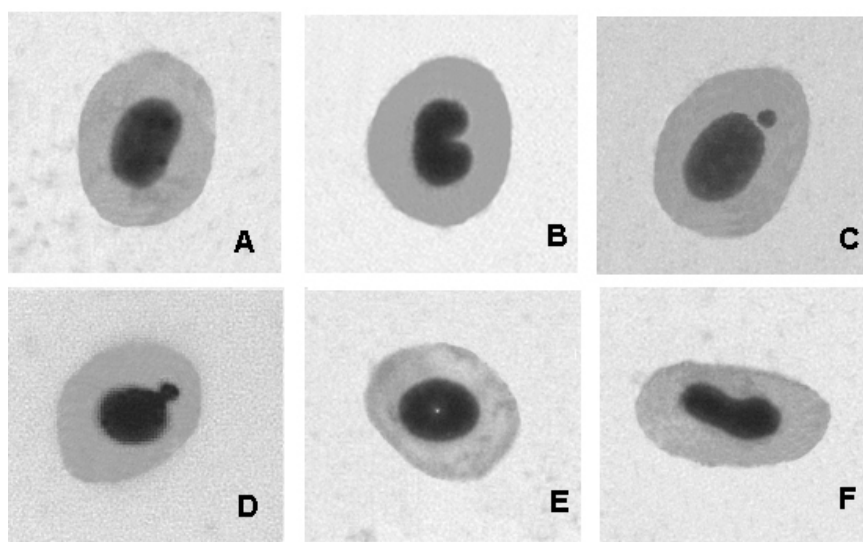


FIGURA 4 ERITRÓCITO NORMAL (A), ERITRÓCITOS COM ALTERAÇÕES DO TIPO NOTCHED (B, F), ERITRÓCITO COM ALTERAÇÃO DO TIPO BLEBBED (D), ERITRÓCITO COM ALTERAÇÃO DO TIPO VACUOLATED (E), ERITRÓCITO COM MICRONÚCLEO (C).

FONTE: O autor (2010).

Na análise do total de alterações morfológicas nucleares, juntamente com a contagem de micronúcleos, o teste estatístico Kruskal-Wallis não demonstrou diferença significativa ($p=0,08$) entre as medianas das alterações totais em nenhum dos grupos contaminados em relação ao grupo controle e nem entre eles (Figura 5).

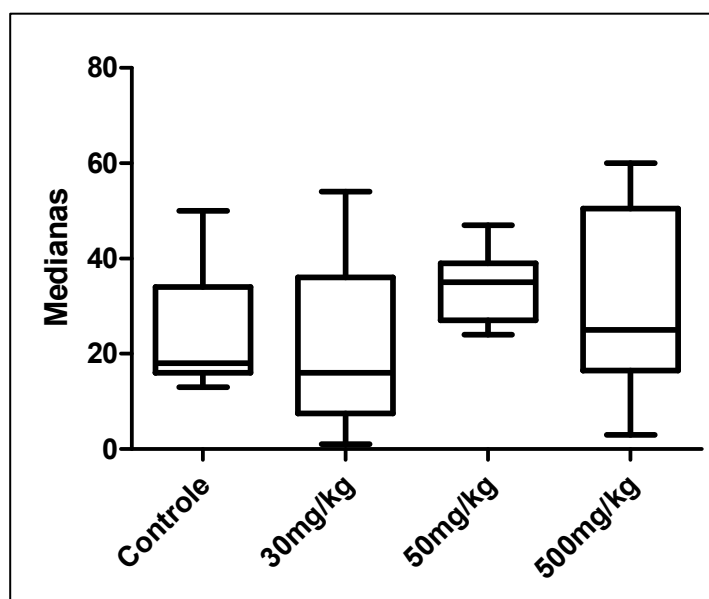


FIGURA 5 GRÁFICO REPRESENTANDO AS MEDIANAS DAS ALTERAÇÕES NUCLEARES TOTAIS OBTIDAS NO GRUPO CONTROLE E NOS TRÊS GRUPOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE COBRE.

FONTE: O autor (2010).

Na análise das alterações morfológicas nucleares do tipo *Vacuolated*, o teste estatístico Kruskal-Wallis também não demonstrou diferença significativa ($p=0,09$) entre as medianas das alterações em nenhum dos grupos contaminados em relação ao grupo controle e entre eles (Figura 6).

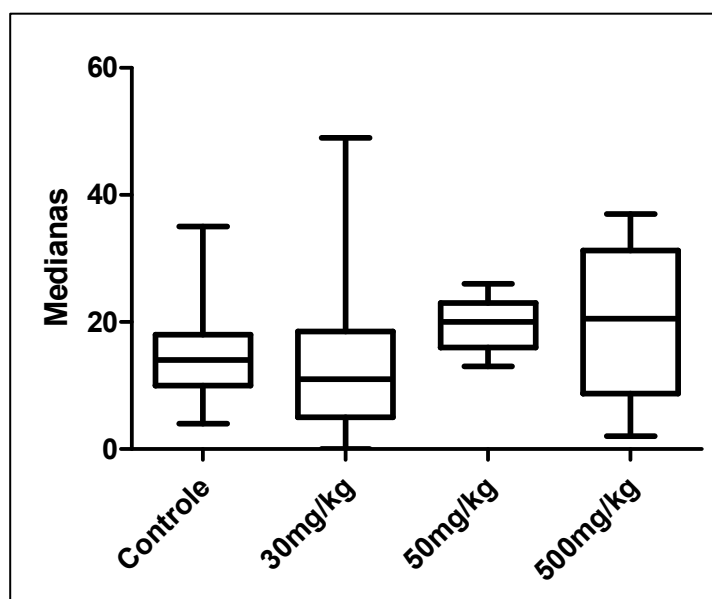


FIGURA 6 GRÁFICO REPRESENTANDO AS MEDIANAS DA ALTERAÇÃO NUCLEAR VACUOLATED OBTIDA PARA O GRUPO CONTROLE E NOS TRÊS GRUPOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE COBRE.

FONTE: O autor (2010).

Na análise das alterações morfológicas nucleares do tipo *Notched*, o teste estatístico Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre as medianas dos grupos contaminados com a concentração de 30mg/kg e 50mg/kg ($p < 0,05$), mas nenhum dos grupos contaminados teve diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 7).

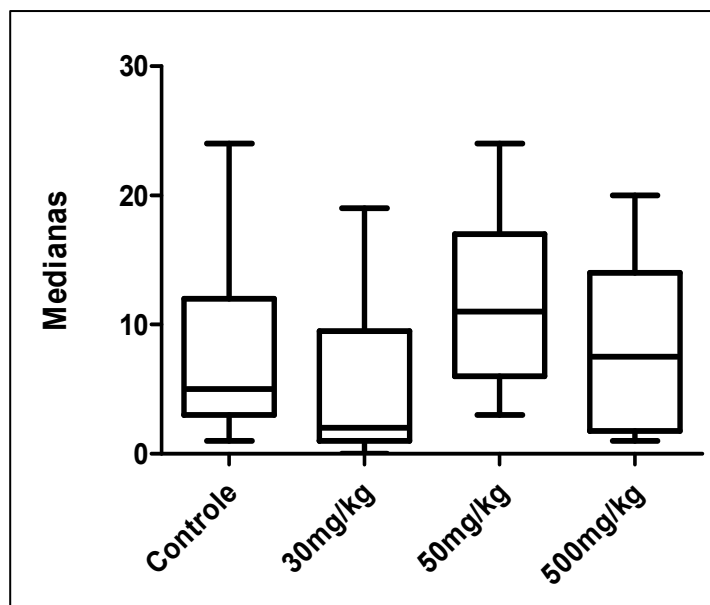


FIGURA 7 GRÁFICO REPRESENTANDO AS MEDIANAS DA ALTERAÇÃO NUCLEAR *NOTCHED* OBTIDAS PARA O GRUPO CONTROLE E PARA OS TRÊS GRUPOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE COBRE.

FONTE: O autor (2010)

5.2 Ensaio Cometa com tecido branquial

Para cada animal foram contados 100 nucleóides e estes foram classificados em 5 classes (Figura 8) foram calculados os escores.

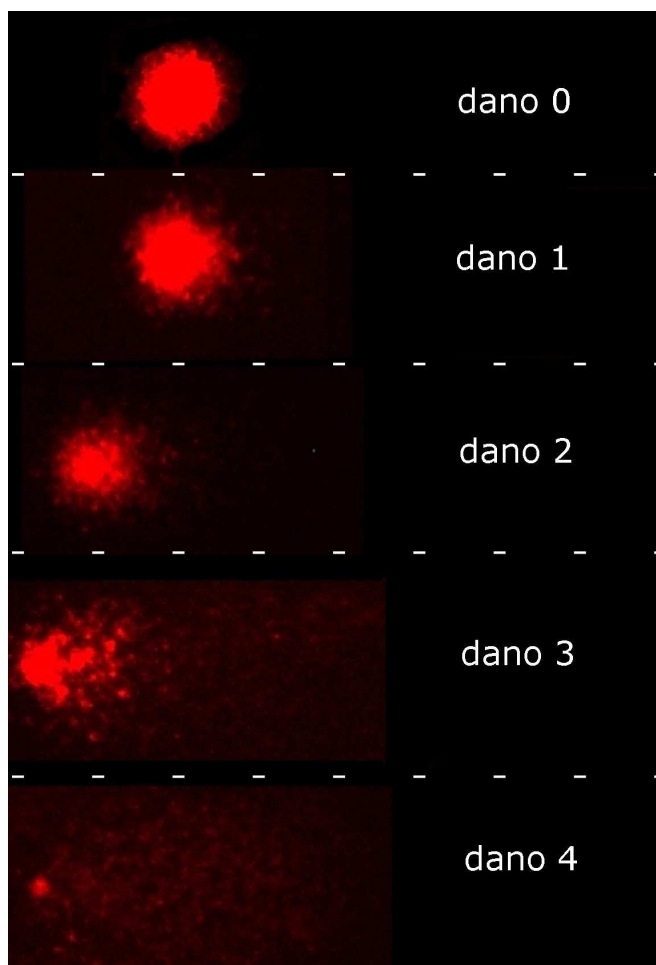


FIGURA 8 CLASSIFICAÇÃO DOS DANOS ENCONTRADOS NO ENSAIO COMETA.

FONTE: O autor (2010).

A análise estatística de Kruskal-Wallis demonstrou uma diferença significativa entre os grupos contaminados com sulfato de cobre em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não foi notada uma diferença significativa entre os grupos contaminados (Figura 9).

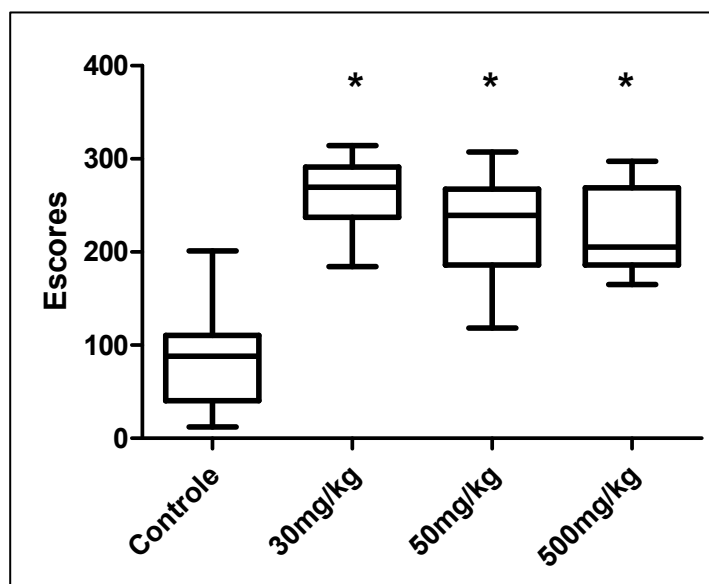


FIGURA 9 GRÁFICO REPRESENTANDO OS ESCORES ENCONTRADOS NO ENSAIO COMETA OBTIDOS PARA O GRUPO CONTROLE E PARA AS TRÊS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO DE COBRE.

FONTE: O autor (2010).

6 DISCUSSÃO

Considerando que o Sulfato de Cobre é hoje um dos principais compostos utilizados em pisciculturas no tratamento da água para eliminação de algas, é importante ressaltar seus efeitos sobre os peixes, e que em função da bioacumulação os efeitos do contaminante podem atingir as populações humanas.

Vários trabalhos referem-se à contaminação subcrônica de Sulfato de cobre (CAVAS, GARANKO, ARKHIPCHUK, 2005; ARKHIPCHUK, GARANKO, 2005, ÇOGUN, KARGIN, 2004; GABBIANELLI et al, 2003; MCKIM, BENOIT, 1971), mas nenhum relacionado à contaminação trófica. O presente trabalho buscou além de testar os danos no DNA provocado pelo sulfato de cobre através das metodologias dos biomarcadores genéticos, também foi avaliada a metodologia para realização da contaminação trófica. Esta metodologia, apesar de trabalhosa, se mostrou eficiente para contaminar em bioensaios tróficos espécimes de *Rhamdia quelen*.

Sobre os resultados do teste do micronúcleo písceo, apesar de não termos encontrado diferença significativa entre o grupo controle e os que sofreram contaminação, encontramos diferença para a alteração *Notched* entre os grupos contaminados com 30mg/kg e 50mg/kg de sulfato de cobre ($p = 0,0051$). Isto sugere que devemos separar as alterações morfológicas nucleares e classificá-las, pois assim podemos demonstrar qual o tipo de malformação é preferencial para o xenobionte testado. Apesar do teste do micronúcleo písceo não tenha dado uma resposta significativa para as contaminações em estudo, ele continua sendo um importante sinalizador de contaminação.

Também não podemos deixar de citar que neste trabalho foi utilizada a técnica de coloração com Giemsa para o Teste do Micronúcleo Písceo, e dessa forma, deixamos de avaliar alguns pontos importantes como à variação de frequência dos eritrócitos jovens e maduros entre os grupos controle e contaminados, pois determinados contaminantes podem influenciar na renovação do sangue. Além disso, a coloração em Giemsa, que pode ter precipitações de corante, e os fragmentos cromossômicos pequenos podem dificultar a avaliação da existência de micronúcleos, o que não acontece quando é utilizada a coloração com laranja de acridina (HAYASHI et al, 1983; UEDA et al., 1992).

O resultado obtido para o Ensaio Cometa demonstrou que o sulfato de cobre é genotóxico para todas as concentrações testadas, isto deixa claro que o tecido branquial é sensível para testar este xenobionte mesmo com contaminação trófica.

Estudos anteriores demonstraram que este tecido pode ser utilizado para avaliar a genotoxicidade com diferentes contaminantes (BELPAEME, COOREMAN, KIRSCH-VOLDERS, 1998; RANK, JENSEN, 2003; RIGONATO, MANTOVANI, JORDÃO, 2005).

Conseguimos observar o comportamento dos peixes após a alimentação na maior concentração (500 mg/kg), e após 10 ciclos de contaminação, os peixes eliminavam pelas brânquias parte da ração preparada com o xenobionte.

Sobre o Ensaio Cometa, é importante ressaltar ainda que, o tipo de dano observado é possivelmente reversível, isso já sendo observado por vários autores em como NACCI et al. (1992) e PANDRANGI et al. (1995). Assim, não podemos afirmar que este dano encontrado pode resultar em danos maiores para o organismo, entretanto não podemos esquecer que os peixes bioacumulam diversas substâncias, prejudicando animais que estão numa posição superior na cadeia alimentar (VAN DER OOST, 2003).

Os resultados encontrados neste trabalho através do biomarcador Ensaio Cometa corroboram o que já encontramos na literatura a respeito da genotoxicidade do Sulfato de cobre (GABBIANELLI et al, 2003; NACCI et al. 1992, RAMSDORF, 2007).

A legislação brasileira estabelece um valor de 30mg/kg de cobre presente em organismos utilizados para consumo humano (BRASIL, 1965), contudo, esta concentração se mostrou genotóxica ao jundiá quando avaliada pela técnica do Ensaio Cometa. A mesma situação é válida para a concentração de 50mg/kg estabelecida pela legislação latina. Por isso seria necessário sugerir uma mudança na legislação visto que está ocorrendo um aumento marcante da produção da espécie *Rhamdia quelen* para consumo em pisciculturas (GOMES et al., 2000).

A concentração de 500mg/kg, por se tratar da dose de cobre na qual se apresentam efeitos subletais em peixes, apresentou para o Ensaio Cometa uma grande quantidade de células em apoptose, e por isso ela não se mostrou

significativamente mais genotóxica que as outras concentrações utilizadas como também não foi detectada esta alta genotoxicidade pelo teste do micronúcleo píceo.

Este trabalho apresentou resultados parciais do projeto de tese de doutorado de Paula da Costa Moiana que está realizando os mesmos testes com outros tecidos além de outros testes genotóxicos. Além disso, alunos de outros professores estão realizando outros testes toxicológicos (bioquímicos e histológicos).

Acreditamos que com a realização de vários testes, que estão sendo realizados no Laboratório de Mutagênese Ambiental, com *Rhamdia quelen* e outras espécies de peixes, submetidas ao Sulfato de Cobre poderemos ao final deles sugerir uma mudança nas legislações, tanto à brasileira quanto a latina, de forma a minimizar os efeitos da bioacumulação de cobre nos animais utilizados para o consumo humano.

7 CONCLUSÕES

Apesar do teste do micronúcleo písceo não ter demonstrado a genotoxicidade do sulfato de cobre em *Rhamdia quelen*, concluiu-se que fazer uma avaliação mais detalhada das anormalidades nucleares pode nos levar à discussões bastante interessantes quanto a maior incidência de um determinado tipo de anormalidade relacionada ao xenobionte utilizado.

Concluiu-se que de um modo geral o Sulfato de Cobre se apresenta genotóxico quando a espécie *Rhamdia quelen* é submetida à contaminação sub-crônica trófica nas concentrações de 30mg/kg, 50mg/kg e 500mg/kg.

O Ensaio Cometa demonstrou a genotoxicidade do sulfato de cobre em *Rhamdia quelen* em todas as concentrações analisadas, conflitando com a legislação brasileira e latina americana.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for copper**. Syracuse: US Department of Commerce, 1990.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research – Genetic Toxicology**, v. 343, p. 121-135, 1995.

ARKHIPCHUK, V. V., GARANKO, N. N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 42–52, 2005.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 221-225, 2001.

BARCELOUX, D. G. Copper. **Clin. Toxicol.**, v.37, n. 2, p. 217-230, 1999.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K. & KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v.415, n.3, p.167-84, 1998.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BRASIL, Decreto nº 55,871 de 26 de março de 1965. Dispõe sobre normas regulamentadoras do emprego de aditivos para alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 9 abr. 1965, Sç. 1.

BURGESS, W. A. **Identificação de possíveis riscos à saúde do trabalhador nos diversos processos industriais**. 2. ed. Belo Horizonte: Ergo, 1995.

CAMAKARIS J., VOSKOBOINIK I., MERCER J.F. Molecular mechanism of copper homeostasis, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 261, p. 225 – 232, 1999.

CAMARGO, S. G. O. DE; POUHEY, J. L. O. F.; VAZ, B. DOS S. Efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos do jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 453-460, 2006.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Sci.**, Ottawa, vol.47, p.2123 – 2136, 1990.

CAVAS, T., GARANKO, N., ARKHIPCHUK V. Induction of Micronuclei and Binuclei in Blood, Gill and Liver Cells of Fishes Subchronically Exposed to Cadmium Chloride and Copper Sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v.43 (4), p.569-574, 2005.

CHAPMAN, P.M. Do sediment toxicity tests require field validation? **Environ Toxicol Chem.**, v. 14, p.451-1453, 1995.

COLLINS, A. R. *et al.* The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, 3, p. 143-151, 2008.

ÇOĞUN, H. I.; KARGIN F. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 55, p. 277-282, 2004.

FERRARO, M. V.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. A. de O.; CESTARI, M.M. . Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: Cometa e dos Micronúcleos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FLEMMING, C.A., TREVORS, J.T. Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. **Water Air Soil Pollut**, v. 44, p. 43–158, 1989.

GABBIANELLI, R.; LUPIDI, G.; VILLARINI, M.; FALCIONI, G. DNA Damage Induced by Copper on Erythrocytes of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* and Mollusk *Scapharca inaequivalvis*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 45, p. 350–356, 2003.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul** (Pices, Pimelodidae). Santa Maria - RS. 100 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. 1980.

HANDY, R. D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** v. 135, p. 25–38, 2003.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. Jr. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus assay. **Mutation Research**, v.120, p. 241-247, 1983.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v. 399 (2), p. 125-133, 1998.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vitro* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p.187-190, 1973.

HILL L.W. JR., SCOTT M.C., KILLEN W.D. A screening level probabilistic ecological risk assessment of copper and cadmium in the Chesapeake bay watershed. **Report US EPA Chesapeake Bay Program Office**, 1997.

HODSON, P.V. The effect of metal metabolism uptake, disposition and toxicity in fish. **Aquatic Toxicology** v. 11, p. 3–18, 1988.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v.104, p.147 – 152, 1982.

HOSE J. E., CROSS J. N., SMITH S. G., DIEHL D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. **Marine Environ. Res.**, v. 22, p. 167–176, 1987.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

KAIM, W., SCHWEDERSKI, B. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of life**, John Wiley & Sons Ltd, cap. 10, 187-214, 1995.

KELLY, J. R., HARWELL, M.A. Indicators of ecosystem response and recovery. *In*: LEVIN, S.A., HARWELL, M.A., KELLY, J.R., KIMBALL, K.D.(Eds). **Ecotoxicology: Problems and Approaches**. New York:Springer-Verlag, p. 9-40, 1989.

LINDER, M. C. Copper and genomic stability in mammals. **Mutation Research**, v. 475, p. 141-152, 2001.

MANA, G. K.; BANERJEE, G.; GUPTA, S. Micronucleus test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish, *Oreochromis mossambica*. **The nucleus**. v. 28, p. 176-179, 1985.

MASUTTI M. B., ESPÍNDOLA E. L. G., NOGUEIRA A. DE M., SIMÕES F. C. F. Sensibilidade a Cobre e Cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 1, p. 37-42, 2006.

MCKIM, J.M., BENOIT, D.A.. Effect of long-term exposure to copper on survival, growth, and reproduction of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **J. Fish. Res. Bd. Can.** v. 28, p. 655-662, 1971

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, v. 367, p. 245-251, 1996.

MOORE, J. W. & RAMMAMORTHY, S. Heavy Metals in natural waters: applied monitoring and impact assessment. **Spring-verlag**, New York, 268p. 1984.

NACCI, D.; NELSON, S.; NELSON, W.; JACKIM, E.; Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves, **Marine. Environmental Research**, v. 33, p. 83-100, 1992.

NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v. 35, p. 197-210, 1996.

PADRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p.345-356, 1995.

PANDULA, M.; CUERVO, M. Legislação de embalagem para contato com alimentos: Mercosul e outros países latinoamericanos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n.001, 2004.

PEDROZO, M. DE F. M.; LIMA, I. V. DE. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental** v. 2, Salvador, 2001.

POWERS, D.A. Fish as model systems. **Science** v. 246, p. 352 – 358, 1989.

PROVOST, G. S.; KRETZ, P. I.; HAMMER, R. T.; MATTHEWS, C. D.; ROGERS, B. J.; LUNDBERG, K. S.; DYCAICO, M. J.; SHORT, J. M. Transgenic Systems for *in vivo* mutation analyses. **Mutation research**, v. 288, p 133-149, 1993.

RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; RIBEIRO, C. A. de O.; COSTA, J. R. M. A.; CESTARI, M.M. . Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, p.77-85, 2009.

RANK, J.; JENSEN, K. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 54, p. 323-9, 2003.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genet. Mol. Biol.* v.28, p. 464-468, 2005

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 722, p. 225-254, 1999.

SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBAH, S.; TSUDA, SHUJI, T.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 393, p. 133 – 139, 1997.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.71, p.127-131, 1975.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia (Teleostei, Pimelodidae)**. Tese de PhD - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experience Cell Research**, v 175, p 184-191, 1988.

SINGH, N. P.; STEPHENS, R. E. Microgel electroforesis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. **Mutation Research**, v 383, p 167-175, 1997.

SOCIETY OF TOXICOLOGY – Site da Society of Toxicology. Disponível em: <http://www.toxicology.org/index.asp>. Acesso em 1 de junho de 2010.

SOUZA-BASTOS L. R.; FREIRE, C. A. The handling of salt by the Neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 289, p. 167–174, 2009.

UEDA, T. *et al.* (1992). A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Wat. Sci. Tech.**, v. 25 n° 11, p. 235-240.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13 p. 57-149, 2003.

YAMAMOTO, K. I.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v.71, p.127-131, 1980.

WANG, F.; GOULET R. R.; CHAPMAN P. M. Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: the gap between laboratory and nature. **Chemosphere**, v. 57, p. 1713-1724, 2004.

WHO (World Health Organization). The control of schistosomiasis: Second report of the WHO Expert Committee, **WHO Technical Report Series 830**, WHO, Geneva, 1993.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 200. **IPCS-International Programme on Chemical Safety**, WHO, Geneva, 1998.